

Détection chez le palmier à huile de dérivés oxygénés d'acides gras polyéniques toxiques pour le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* ; variation de leur accumulation selon les croisements et les modalités de traitement

A. VERNENGHI (1), B. TAQUET (2), J.L. RENARD (3) et A. RAVISE (1)

Résumé. — Dans les tissus de jeunes palmiers à huile inoculés par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* s'accumulent des alcools diéniques dérivant du linoléate de méthyle. Ces dérivés oxygénés, non décelés avant l'infection, sont accumulés à des concentrations différentes selon les origines génétiques des lignées éprouvées. De même leur accumulation dans les tissus peut être modulée par l'application de plusieurs éliciteurs fongiques ou de synthèse. Les alcools diéniques sont toxiques *in vitro* pour l'agent pathogène. Il existe un important effet de synergie entre ces substances et les phytoalexines phénoliques du palmier à huile.

INTRODUCTION

L'évolution de la fusariose vasculaire du palmier à huile dans les différentes aires élaeicoles d'Afrique laisse présumer qu'à plus ou moins long terme 500 000 ha de replantations seront concernés par la maladie [Renard et Ravise, 1986].

Depuis 25 ans, à l'IRHO les recherches conjointes en sélection et en phytopathologie ont permis, à partir de matériels collectés au cours de prospections, de sélectionner des caractères de tolérance chez l'*Elaeis guineensis* et l'*Elaeis oleifera* [Renard *et al.*, 1980]. Les transferts de ces caractères sont effectués par sélection récurrente réciproque [Meunier et Gascon, 1972], la tolérance des lignées étant éprouvée en préépinière selon des critères codifiés [Renard *et al.*, 1972].

Récemment, plusieurs facteurs de résistance, ou phytoalexines, contribuant aux mécanismes de défense contre la fusariose ont été identifiés chez le palmier à huile [Taquet, 1985]. Chez de jeunes plants en préépinière ou en serre, les réactions de défense peuvent être stimulées par prémunition à l'aide d'une souche avirulente de *Fusarium oxysporum* [Taquet *et al.*, 1983] ou par des traitements à l'aide de plusieurs éliciteurs fongiques [Taquet *et al.*, 1985 a et b].

Nous présentons les caractéristiques et les propriétés inhibitrices d'un nouveau groupe de phytoalexines décelé chez le palmier à huile : des dérivés oxygénés du linoléate de méthyle. Précédemment, des produits similaires ont été identifiés chez le riz en réaction à la pyriculariose [Kato *et al.*, 1983 ; 1986] et chez des cultivars de tomate résistants à des *Phytophthora* sp. et *Verticillium albo-atrum* [Vernenghi 1985 ; Vernenghi *et al.*, 1985]. De même, chez le tabac,

une réaction de peroxydation des lipides membranaires contribue aux mécanismes de résistance par hypersensibilité contre des infections bactériennes [Keppler et Novacky, 1986].

Nous avons également cherché à établir par des méthodes chromatographiques si la synthèse et l'accumulation des dérivés oxygénés du linoléate de méthyle dans des tissus de plants inoculés peuvent être modulées par l'application d'éliciteurs ou de leurs analogues structuraux préparés avec ou sans encapsulation dans des cyclodextrines.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Matériel végétal.

Le matériel végétal utilisé correspond aux croisements et au clone produits par l'IRHO (Tabl. I) :

TABEAU I

Croisements	Hybride reproduit	Code	Age des plants
L1904D × L2282P	D10D × L2T	C 1401	7 mois
L1904D × L2227P	D10D × L2T	C 1401	7 mois
L3412D × L2259P	(D5D × D3D) × L2T	C 2501	8 mois
L4570D × L2466P	(D5D × D3D) × L2T	C 2501	6 mois
L2544D × L2256P	D115D × L2T	C 1001	4 mois
L 9 T × L 435T			4 mois
L 435T × L 9 T			4 mois
L 9 T × L 431T			4 mois
Le clone est issu d'un palmier de la lignée LM 5305 = L2516D × L2270D (C 1001)			

Chaque plant issu de graine germée est repiqué en pot individuel en conditions contrôlées de température (de 22 à 28 °C) et d'hygrométrie (60 à 90 %) en serre. Une pulvé-

(1) Laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM, 72, Route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(2) IRHO-CIRAD, B.P. 8 Dabou (Côte d'Ivoire).

(3) IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France)

sation d'eau 2 ou 3 fois par jour évite le dessèchement de l'atmosphère et de la terre. La nutrition des plants est assurée par des apports tous les 15 jours d'environ 50 ml d'une solution minérale de la composition suivante, par litre d'eau : 2 g d'urée, 2 g de sulfate de magnésium, 4 g de potassium.

A Dabou (Côte d'Ivoire), dans les conditions naturelles, la température moyenne est de 28 °C et l'humidité relative de l'air est au minimum de 80 %.

Le champignon parasite.

Les souches M 80 et M 179 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* (FOE) ont été utilisées pour toutes les expériences. Elles ont été isolées de tissus de palmier sur la station IRHO de Dabou et sont cultivées sur milieu synthétique liquide, en fioles de Roux, ou gélosé, en boîtes de Petri, de composition et concentration suivantes par litre :

- Glucose : 30 g,
- $\text{NO}_3 \text{ Na}$: 2 g,
- $\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$: 1,4 g,
- $\text{SO}_4 \text{ Mg}$: 0,75 g,
- $\text{SO}_4 \text{ Fe}_2$: 1 mg,
- Eau distillée : 1 000 ml.

Techniques d'inoculation.

L'inoculum est constitué d'un mélange de deux cultures obtenues sur milieu liquide et dilacérées à l'aide d'un broyeur Turmix pendant 1 min puis dilué 5 fois. Ce broyat est déposé au collet des plants à raison de 25 ml/plant, ce qui correspond à environ 4.10^6 propagules. Cet inoculum est multiplié par un facteur 2 ou 4 pour les expériences réalisées en serre à Bondy (France).

Conduite des essais.

La durée d'inoculation varie selon les séries expérimentales : 3 à 5 mois à Dabou en préépinière (correspondant au temps moyen d'expression de symptômes de fusariose) et de 1,5 à 2 mois à Bondy en serre.

Modulation des réactions de défense.

Les essais de stimulation des mécanismes de défense sont réalisés à partir de plants issus de graines âgés de 4 à 7 mois ou de clones provenant de multiplication végétative âgés de 4 à 20 mois.

Les éliciteurs sont appliqués à la dose de 1 mg par plant pour la galactosamine, l'acide arachidonique ou ses dérivés mono- et dihydroxylés, et de 2 mg par plant pour les dérivés hydroxylés de l'acide linoléique.

L'enrobage de l'acide arachidonique ou de son dérivé monohydroxylé dans la β -cyclodextrine est réalisé sous vide à 80 °C dans l'eau distillée [Vernenghi, Kunesch *et al.*, 1986] : 1 mg d'acide arachidonique correspond à 10 mg de complexe. Le complexe ainsi obtenu est soit incorporé au sol, soit introduit directement sous forme de poudre dans le pseudobulbe de la plante.

Dans ce dernier cas, une cavité est pratiquée à l'emporte-pièce à la base du palmier de façon à ne pas léser le méristème de la plante ; après introduction du complexe, l'orifice est refermé à l'aide de mastic à greffer.

Les traitements peuvent être simultanés à l'infection avec, ensuite, une périodicité hebdomadaire ou bimensuelle, ou bien différés de 2 ou 3 semaines avec une application de rappel.

Récolte et observations.

En milieu naturel à Dabou en préépinière, la fusariose du palmier s'apprécie par l'observation des symptômes foliaires (rabougrissement, dessèchement) et du brunissement des vaisseaux (coupe de pseudobulbe). Les racines d'aspect sain et les racines présentant des symptômes de fusariose sont donc récoltées séparément et conservées dans l'éthanol au froid.

En absence de symptômes, à Bondy, tous les plants sont récoltés et les racines directement congelées.

Dans les deux situations, le poids de tissus frais est noté.

Préparation des extraits bruts de racines.

Les tissus racinaires de chaque motif sont broyés dans l'éthanol après découpage grossier. Le broyat ainsi obtenu est mis à diffuser à l'obscurité pendant 24 heures avant d'être épuisé une seconde fois, dans les mêmes conditions.

Une partie aliquote, correspondant à 50 g de tissus frais, est séchée sous vide à 40 °C. L'extrait sec est ensuite repris par l'éthanol à raison de 1 ml pour 5 g de tissus frais et conservé au froid. Les extraits excédentaires des lignées et des clones sont rassemblés, cet échantillon global volumineux servira à la recherche et à l'extraction des diénols.

Purifications préliminaires.

L'extrait racinaire brut subit une première purification par partition dans l'hexane. Toutes les substances apolaires, dont les diénols, sont entraînées par l'hexane tandis que les produits plus polaires restent dans la phase éthanolique.

Les diénols sont ensuite isolés par quatre chromatographies successives sur plaques préparatives 20 × 20 cm de silice GF éluées par le mélange Hx-Ae (5 : 1).

Techniques analytiques par chromatographie sur plaques en couche mince.

Les extraits étudiés sont analysés sur plaques de silice en couche mince (C.C.M.).

Les principaux mélanges éluants sont :

- Hexane — acétate d'éthyle [Hx — Ae (5 : 1)],
- Hexane — acétate d'éthyle — méthanol [Hx — Ae — Me (50 : 50 : 5)],
- Chloroforme — méthanol [clf — Me (95 : 5)].

La révélation des différents constituants de l'extrait s'effectue à l'aide de plusieurs réactifs :

- trichlorure d'antimoine (Sb Cl_3) à saturation dans le chloroforme à 120 °C pendant 10 min.,
- solution de K Mn O_4 à 1 % dans 2 % de $\text{Na}_2 \text{ CO}_3$.

Chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.).

L'analyse des extraits bruts de tissus est réalisée en C.L.H.P. sur colonne de silice 5 μ 6,3 mm × 25 cm. Les systèmes éluants correspondent à des mélanges de polarité croissante d'hexane-acétate d'éthyle-méthanol 90.

La purification et la caractérisation des diénols sont réalisées sur différents supports :

- colonne de silice 5 μ 12,7 mm × 50 cm,
- colonne de silice 5 μ 10 mm × 30 cm,
- colonne de silice 5 μ CN 10 mm × 30 cm.

Les systèmes d'élution sont les suivants :

- Hx — Ae (100 : 10) et (100 : 20),
- Hx — Ae — Me (100 : 30 : 3) et (50 : 50 : 5),
- colonne de silice 5 μ greffée en C18 10 mm \times 30 cm.

Les éluions sont réalisées par des solutions aqueuses d'acétonitrile ou de méthanol.

La détection des substances est assurée par un détecteur ultra-violet à 280 nm et par réfractométrie.

Etudes structurales et spectrométriques.

La détermination des structures chimiques est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (C.G.-S.M.) sur un appareil Nermag R10-10C piloté par ordinateur, en impact électronique et en ionisation chimique. Le couplage est réalisé avec un chromatographe Girdel 32 équipé d'une colonne capillaire de 25 cm chargée de CP Wax 57.

Les spectres dans l'ultra-violet sont établis avec un spectrophotomètre Beckman 24 dans le méthanol redistillé.

Tests biologiques de toxicité *in vitro*.

• Tests avec le *Cladosporium cladosporioides* :

Après la chromatographie des extraits étudiés en C.C.M., la plaque est pulvérisée avec une suspension de spore de *Cladosporium cladosporioides* et imprégnée ensuite d'un film de milieu pomme de terre gélosé (PDA). La plaque est mise à incuber en étuve à 27 °C, dans l'obscurité et en humidité proche de la saturation pendant 48 heures. Les plages blanches, où le champignon ne se développe pas, correspondent à des zones d'accumulation de substances toxiques.

• Tests avec F.O.E. :

La toxicité des diénols et ses effets de synergie avec des composés phénoliques sont testés sur la croissance du thalle du F.O.E. et sur la germination de ses spores.

— En milieu liquide.

Les conidies éprouvées sont obtenues à partir de la filtration sur tissu de cultures de champignon. Les substances testées sont incorporées à des concentrations connues au milieu de culture dont la composition est identique à celle servant à la conservation des souches. Les tests sont réalisés en flacons d'Erlenmeyer, régulièrement agités pendant 15 heures dans un bain-marie à 27 °C ou sur lames à concavité, incubées à l'obscurité à la même température : le taux de germination est évalué par comptage des spores germées au microscope (minimum de 1 000 spores par répétition).

— En milieu gélosé.

Les substances à tester — diénols et composés phénoliques — sont incorporées à des concentrations connues dans le milieu gélosé maintenu liquide par une plaque chauffante. Les lames sont coulées, l'implant de F.O.E. déposé et l'ensemble recouvert d'une lamelle protectrice.

Les lames sont lutées à la lanoline afin d'éviter tout dessèchement de la gélose. L'incubation est réalisée en étuve à 27 °C pendant 48 heures. La croissance du thalle, le pourcentage de spores germées et l'élongation des tubes germinatifs sont évalués sous microscope.

RÉSULTATS

1. — Mode d'obtention des diénols.

Les dérivés oxygénés d'acides gras polyéniques sont extraits en plusieurs étapes de 15 kg de tissus de racines de palmiers à huile inoculés.

La phrase liquide est séparée de l'extrait brut éthanolique par partition dans l'hexane. Cette fraction correspond à 80 g dont 20 g ont été utilisées pour les purifications. Elle est chromatographiée à quatre reprises sur plaques préparatives (0,75 mm) de silice GF (254) avec, pour éluant, le mélange Hx-Ae (5 : 1).

Dans ces conditions, les diénols se trouvent concentrés dans une zone comprise entre Rf 0,45-0,55. Le poids de cette fraction après la première chromatographie est de 150 mg. Il se réduit à 110 mg après le quatrième passage sur plaques.

La fraction enrichie en diénols est purifiée en C.L.H.P. sur colonne de silice 5 μ 12,7 mm \times 50 cm éluee par le mélange Hx-Ae (100 : 20), puis sur colonne de silice 5 μ CN 10 mm \times 30 cm où les diénols sont élués après 16 à 28 min. de rétention par le mélange Hx-Ae (100 : 10) à 0,7 ml/min. (Fig. 1). La détection des produits est assurée par réfractométrie et par un détecteur ultra-violet.

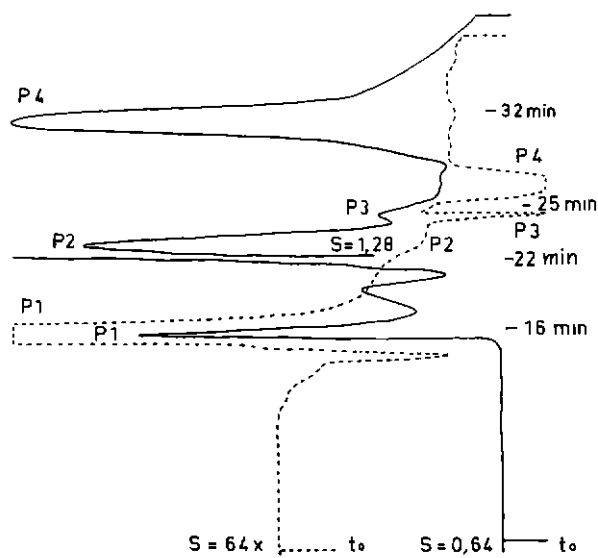


FIG. 1. — Elution d'alcools diéniques de synthèse sur colonne de silice 5 μ CN 10 mm \times 30 cm par le mélange Hx-Ae (10 : 1) d = 0,7 ml/min, V = 5 mm/min. Poids injecté : env. 0,5 mg dans 250 μ l d'éluant.

Les pics P1, P2 et P3 correspondent aux isomères, le 1^{er} pic réfractométrique au linoléate de méthyle.

Double détection : U V à 280 nm, 1 mV à S = 0,64 puis 1,28 (—) ; réfractométrique, 100 mV à S = 64 \times (---).

La fraction finale obtenue pèse 5 mg, elle contient encore plusieurs esters d'acides gras décelés en C.G. — S.M.

A chaque étape de purification, la présence des substances inhibitrices est vérifiée à l'aide d'un test de toxicité en C.C.M. pour le *C. cladosporioides*.

2. — Caractérisation des diénols.

Les diénols extraits des tissus de palmiers à huile sont caractérisés par référence aux diénols de synthèse [Vernenghi *et al.*, 1985] et aux produits naturels décelés dans la tomate par différentes techniques chromatographiques et spectrométriques [Vernenghi, 1985].

a) En chromatographie sur couche mince de silice (C.C.M.).

La migration des diénols naturels ou de synthèse est étudiée dans plusieurs systèmes qui séparent faiblement les deux principaux isomères comme l'indique le tableau II :

TABLEAU II

Rf \ Eluant	Hx-Ae (5 : 1)	clf-Me (95 : 5)	Hx-Ae-Me (50 : 50 : 5)
	0,48-0,52	0,80-0,82	0,88-0,90

Les diénols sont colorés en bistre foncé par le trichlorure d'antimoine à saturation dans le chloroforme à 110 °C. Une coloration jaune intense qui vire au brun en quelques heures est obtenue après pulvérisation de $MnO_4 K$.

b) En chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.).

Les recherches sont réalisées avec deux types de supports : d'une part des colonnes de silice sphérique 5μ , d'autre part des colonnes de silice 5μ greffée en C18 ; dans les deux cas le repérage des produits est assuré par un détecteur ultra-violet à 280 nm et par réfractométrie.

Les caractéristiques d'élution sont les suivantes :

— sur colonne de silice 5μ 10 mm \times 30 cm élue par le mélange Hx-Ae-Me (100 : 30 : 3) ou (50 : 50 : 5) à 2 ml/min., les temps respectifs de rétention sont de 9 à 11 min. et de 8 à 10 min. pour les différents isomères ;

— sur colonne de silice 5μ greffée en C 18, 10 mm \times 30 cm, les alcools diéniques sont élués par le méthanol ou l'acétonitrile 80 % à 2 ml/min. après 7 min. de rétention.

c) Repérage des diénols par C.L.H.P. analytique dans les extraits bruts de tissus de racines.

L'intensité des réactions de défense des différentes lignées ainsi que des clones est analysée en C.L.H.P. à partir des extraits bruts de tissus de racines. L'éluant est un système ternaire Hx-Ae-Me 90 de polarité croissante (50 : 50 : 5, zone α ; 20 : 100 : 15, zone β ; 20 : 100 : 60, zone γ ; 20 : 100 : 300, zone δ). Sur une colonne de silice 5μ de 6,3 mm \times 25 cm les deux isomères de diénols de synthèse sont élués dans le premier mélange après 3 min. de rétention pour un débit de 1,5 ml/min. (Fig. 2). Nous avons vérifié que dans cette partie du chromatogramme aucune autre substance inhibitrice majeure n'est éluee avec les diénols.

Nous indiquons dans le chapitre 3 les variations de teneurs relatives en diénols dans les extraits bruts de racines des différents échantillons étudiés en fonction de la réaction à la fusariose en préépinière ou en serre.

d) Caractères spectroscopiques.

— *Spectre dans l'ultra-violet (U.V.).*

Le spectre U.V. des diénols de synthèse (9-OH et 13-OH) établi dans l'éthanol redistillé présente un maximum à 232 nm et deux pics à 276 nm et 265 nm, un minimum à 260 nm. Dans les mêmes conditions, le spectre U.V. des diénols de palmier à huile possède les mêmes λ max.

— *Spectres de masse.*

Avec le couplage CG-SM, sur colonne capillaire chargée de phase polaire CP Wax, les diénols du palmier à huile sont élués à 220 °C. Les spectres de masse établis en impact électronique permettent de distinguer les isomères par analogie avec les fragmentations de substances de référence [Vernenghi, 1985]. L'hydroxy-9 octadécadien-10, 12 oate de méthyle est caractérisé par $M^+ = 310$; m/z 292 (M-18), 185, 153, 125 ; l'hydroxy-13 octadécadien-9, 11 oate de méthyle par $M^+ = 310$, m/z 292 (M-18), 155, 99.

Des spectres sont également réalisés en ionisation chimique (I.C.) soit par l'ammoniac soit par le monoxyde d'azote. Dans le cas de l'I.C./ NH_3 se distinguent les ions $M+18 = 328$, $M^+ = 310$, $M+1 = 311$; m/z 293. En I.C./No les ions les plus caractéristiques sont $(M+No)^+ = 340$, $M^+ = 310$, m/z 308 (M-2), 298 (M-18), 185, 155. La formation de l'ion $(M-2)^+$ est liée à la présence d'un alcool dont la réactivité avec No est connue pour donner des produits d'oxydation.

L'hydrogénation catalytique des substances naturelles et de synthèse est réalisée par 2 voies, d'une part avec l'oxyde de platine dans le méthanol, d'autre part sur du charbon palladié. Dans les 2 cas, elle aboutit à des esters méthyliques des acides hydroxy-9 octadécanoïque et hydroxy-13 octadécanoïque. Les 2 isomères présentent, en impact électronique, les mêmes caractéristiques :

$M^+ = 314$; m/z 187, 158, 155, 87, 83, 74, 69, 67, 55.

Les ions 187 et 158 sont caractéristiques de la fragmentation de l'hydroxyle avec réarrangement d'un hydrogène.

Comme dans le cas des diénols de la tomate [Vernenghi *et al.*, 1986], le traitement par le chlorure d'acétyle aboutit dans un bref délai à la formation d'un triène.

3. — Etude comparative de l'accumulation de diénols dans les tissus de racines inoculées.

Avec le système d'analyse en C.L.H.P. sur colonne de silice 6,3 mm \times 25 cm avec éluants ternaires (décrits ci-dessus), nous avons procédé à deux types d'investigations. Après l'identification en C.G.-S.M. des diénols du palmier à huile, nous avons précisé leurs conditions d'élution par rapport à celles des diénols de synthèse, injectés périodiquement comme substances de référence. Ainsi, pour toutes les études de modulation des réactions de défense par différents médiateurs, une appréciation directe est obtenue.

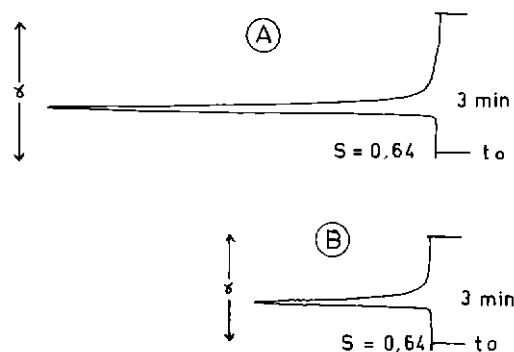


FIG 2. — Elution d'alcool diénique de synthèse sur colonne de silice 5μ 6,3 mm \times 25 cm par le mélange ternaire Hx-Ae-Me 90 (50 : 50 : 5) d = 1,5 ml/min, V = 5 mm/min, U.V. 280 nm, 1 mV à 5 = 0,16.

Temps de rétention : 3 min.

a = environ 10 μ g,

b = environ 5 μ g dans 25 μ l d'éluant

Par ailleurs, nous avons comparé les pics correspondants sur les enregistrements chromatographiques de séries expérimentales homogènes réalisées tant en préépinière de Côte d'Ivoire qu'en serre à Bondy.

a) Réactions aux infections expérimentales.

Les analyses chromatographiques ont permis d'établir que, parmi les géniteurs, plusieurs *dura* autofécondés possèdent une bonne aptitude à élaborer des diénols. Les recherches ont également concerné les croisements étudiés dans un test diallèle [Meunier *et al.*, 1979]. Parmi ceux-ci, le croisement L 9 T \times L 435 T et le croisement inverse L 435 T \times L 9 T manifestent une importante réaction ; une intensité quasi comparable est décelée chez le croisement L 9 T \times L 431 T.

Pour ces extraits de tissus, l'intensité du pic correspondant à l'accumulation de diénols est plus importante dans le cas de plants inoculés d'aspect sain que chez les plants fusariés, de l'ordre de 20 % pour le croisement L 9 T \times L 435 T (Fig. 3).

Les analyses réalisées avec des diénols de synthèse comme marqueurs permettent de confirmer les différences de réactions entre lignées. Ainsi, pour plusieurs lignées reproduisant le même hybride L 2 T \times D 10, inoculées dans les mêmes conditions expérimentales s'observent des accumulations différentes de diénols dans les tissus racinaires de plants d'aspect sain. L'analyse en C.L.H.P. des extraits de tissus révèle que dans le cas du croisement le plus tolérant l'intensité du pic correspondant aux diénols est triplée par rapport aux autres.

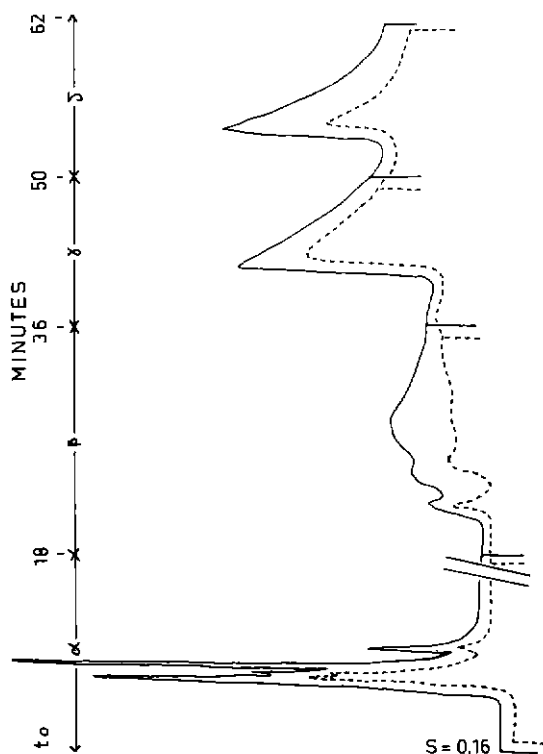


FIG. 3. — Chromatographie comparative en C.L.H.P. d'extraits de tissus de racines inoculées par le FOE d'aspect sain (—) ou d'aspect fusarié (---) du croisement L 9 T \times L 435 T (0,1 g de tissus frais).

Colonne de silice 5 μ — 6,3 mm \times 25 cm —, détection U.V. à 280 nm. Elution par mélanges ternaires Hx-Ae-Me 90 dans les proportions :
 α = 50 : 50 : 5,
 β = 20 : 100 : 15,
 γ = 20 : 100 : 60,
 δ = 20 : 100 : 300
 d = 1,5 ml/min, V = 5 mm/min.

b) Influence des traitements par éliciteurs sur l'accumulation de diénols.

La comparaison porte sur les effets de l'application de plusieurs substances élicitrices en serre à des plants âgés de 4 à 20 mois issus de clones ou provenant de lignée.

— La galactosamine.

En application hebdomadaire ou bimensuelle sur le croisement L 2544 D \times L 2256 P âgé de 4 mois, la galactosamine induit une augmentation de 15 à 20 % du pic correspondant aux diénols.

— L'acide arachidonique.

La réaction à l'acide arachidonique est très variable selon le matériel végétal testé et selon les modes d'application. Ainsi, la meilleure réaction de plants âgés de 4 mois du croisement D 115 D \times L 2 T est obtenue avec un traitement simultané et un rappel bimensuel (40 % d'augmentation de la surface du pic diénol par rapport au témoin inoculé). Des traitements différés par rapport à l'inoculation s'avèrent moins efficaces, même avec des rappels hebdomadaires (augmentation de l'ordre de 10 %). Dans le cas d'une lignée reproduisant le croisement L 2 T \times D 10 (Fig. 4), particulièrement plastique, la réaction des plants à l'élicitation est importante : avec des plants âgés de 7 mois l'augmentation des taux de diénols varie de 90 à

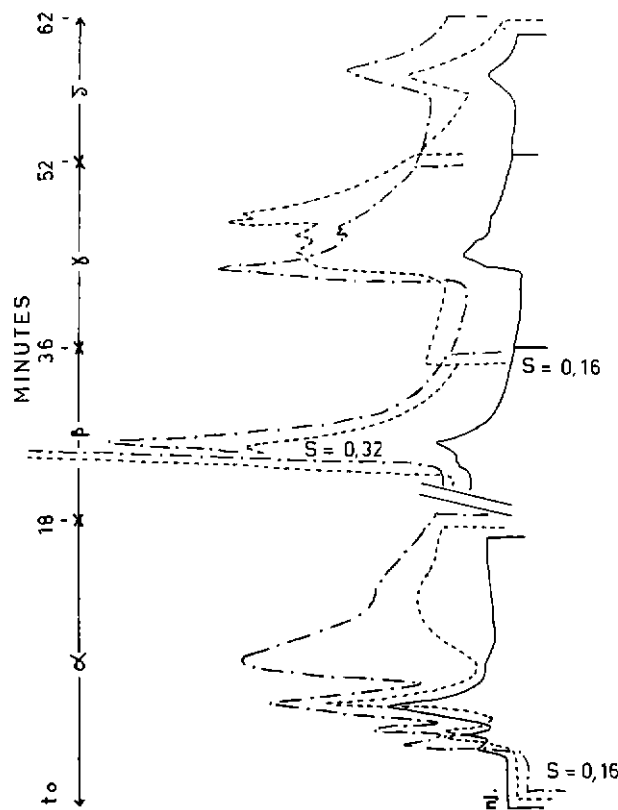


FIG. 4. — Chromatographie comparative en C.L.H.P. d'extraits de tissus de racines de plants inoculés par le FOE et traités ou non par des éliciteurs (0,1 g de tissus frais). Croisement L 2 T \times D 10, âge 8 mois.

— : plants inoculés FOE,
 - - - : plants inoculés FOE et traités par acide arachidonique,
 - · - : plants inoculés FOE et traités par l'acide arachidonique protégé incorporé dans le pseudobulbe.

Conditions expérimentales : voir fig. 3.

160 % selon la périodicité du traitement. Au contraire, chez les deux autres lignées reproduisant le même croisement, peu modulable, l'application d'acide arachidonique lors de l'infection provoque un accroissement de teneurs en diénols de l'ordre de 10 % dans les tissus ; des traitements ultérieurs, à différentes périodicités, ne modifient pas leur accumulation.

— *Les dérivés mono- et dihydroxylés de l'acide arachidonique.*

Les expériences sont réalisées avec 2 lignées reproduisant le croisement L 2 T × D 10, aux réactions équivalentes et avec des plants du même âge. Les dérivés hydroxylés sont apportés simultanément à l'inoculation, aucun rappel n'est effectué pendant la période d'incubation de 4 semaines. Il semble que le dérivé monohydroxylé ait une action plus efficace sur la synthèse des diénols que le dérivé dihydroxylé puisque les surfaces de pic sont respectivement augmentées de 100 et de 80 % par rapport aux plants inoculés sans traitement.

— *Acide arachidonique et dérivé monohydroxylé protégés par la β -cyclodextrine.*

Les modalités d'application sont comparées sur un clone (L 2516 D × L 2270 P) et sur une lignée reproduisant le croisement L 2 T × D 10 (plants âgés de 6 mois). Le complexe éliciteur est soit incorporé dans le sol, soit introduit directement dans le pseudobulbe de la plante. La stimulation de la réaction de défense est décelable dès le premier prélèvement après 4 semaines d'incubation. Pour le croisement L 2 T × D 10, après 7 semaines (Fig. 4), les modulations d'intensité du pic diénol sont respectivement de 37 % (sol) et 18 % (pseudobulbe) par rapport aux plants inoculés non traités. Contrairement à ces résultats, les intensités des autres pics de chromatographie sont plus importantes dans le cas de l'incorporation de l'éliciteur dans le pseudobulbe ; les expériences suivantes sont donc réalisées par ce procédé.

Dans le cas du clone, pour des plants âgés de 8 mois, la stimulation semble maximale au prélèvement effectué à 3 mois (environ 120 %) puis régresse à 4 mois 1/2 alors que les autres pics demeurent stables pendant cette période.

Un seul des essais concernant l'action du dérivé monohydroxylé est achevé, il concerne des plants de 11 mois d'une lignée reproduisant le croisement L 2 T × D 10. Les analyses effectuées 1 mois et 6 mois après l'inoculation et le traitement indiquent que le dérivé hydroxylé et protégé par les cyclodextrines provoque une accumulation durable de diénols dans les tissus : 55 % à 1 mois et 24 % à 6 mois de plus que dans les plants inoculés.

— *Les diénols de synthèse dérivés du linoléate de méthyle.*

L'étude est réalisée par application au niveau des racines sur des plants d'une lignée reproduisant le croisement L 2 T × D 10 âgés de 5 mois et d'un clone (L 2516 D × L 2270 P) âgé de 14 mois avec des durées d'incubation de 4 à 7 semaines. Le traitement est simultané à l'inoculation.

Après 5 semaines d'incubation, le semis et le clone ne présentent aucune modification du taux de diénols par rapport aux plants inoculés. Par contre, après 7 semaines, une nette augmentation de la surface du pic diénol apparaît en C.L.H.P. (+ 33 %). D'après ces essais, les alcools diéni-

ques semblent avoir un effet tardif sur l'accumulation des diénols de l'hôte.

— *Les triénols de synthèse dérivés du linoléate de méthyle.*

Les traitements sont appliqués à des plants correspondant au croisement L 2 T × D 10 dans les mêmes conditions que pour les diénols de synthèse ci-dessus.

Un mois après l'inoculation, l'augmentation du pic correspondant aux diénols est d'environ 30 %. La réaction reste stable dans le temps.

4. — Recherches sur l'inhibition du parasite *in vitro*.

Plusieurs techniques sont employées :

- germination de microconidies et croissance des tubes germinatifs en milieux liquide ou gélosé,
- croissance sur milieu gélosé en boîtes de Petri,
- croissance pondérale en milieu liquide,
- croissance d'un microthalle sur lames recouvertes de milieu gélosé.

Tous les essais en milieu liquide aboutirent à des échecs car les diénols ne restent pas en suspension dans la phase aqueuse (même avec agitation mécanique) et forment un film à la surface. Dans ces conditions, les pourcentages d'inhibition varient d'une série à l'autre.

Nous présentons seulement les résultats obtenus en milieu gélosé étalé sur lames de microscopie et recouvert d'une lamelle après dépôt du microthalle. En effet, lors des essais en boîtes de Petri, la durée de solidification du milieu gélosé est plus grande et nous avons observé une séparation de phase avec une localisation irrégulière des diénols.

a) Inhibition de la germination des microconidies.

Sur lames gélosées, le taux de germination des conidies ne semble pas fortement altéré par l'incorporation des inhibiteurs. En 48 heures chez le témoin, environ 85 % des conidies sont viables. La figure 5 indique les inhibitions observées. Dans tous les essais, les diénols sont incorporés au milieu à une concentration de 30 $\mu\text{g/ml}$ et les phénols de 100 $\mu\text{g/ml}$. Seuls les diénols, l'acide caféique et l'acide férulique diminuent au moins de moitié le taux de germination.

b) Inhibition de l'élongation des tubes germinatifs.

Celle-ci est suivie pendant deux jours, au-delà de cette période il n'est plus possible d'individualiser avec certitude les filaments. Il semble que, au moins pendant une partie de cette phase, les échanges avec le milieu extérieur soient faibles. En effet, comme l'indique la figure 6, la croissance des tubes germinatifs chez le témoin est peu différente de celle dans les motifs contenant de l'acide caféique, de l'aldéhyde benzoïque, de l'acide dihydroxybenzoïque ou de la vanilline. Par contre, les diénols réduisent d'environ 1/3 l'élongation des tubes germinatifs.

c) Inhibition de la croissance des microthalles (Fig. 7).

La reprise des implants témoins est très rapide. La croissance moyenne des hyphes est de l'ordre de 2 200 μm en 3 jours. L'inhibition provoquée par les diénols est de l'ordre de 65 % par rapport à la croissance du témoin,

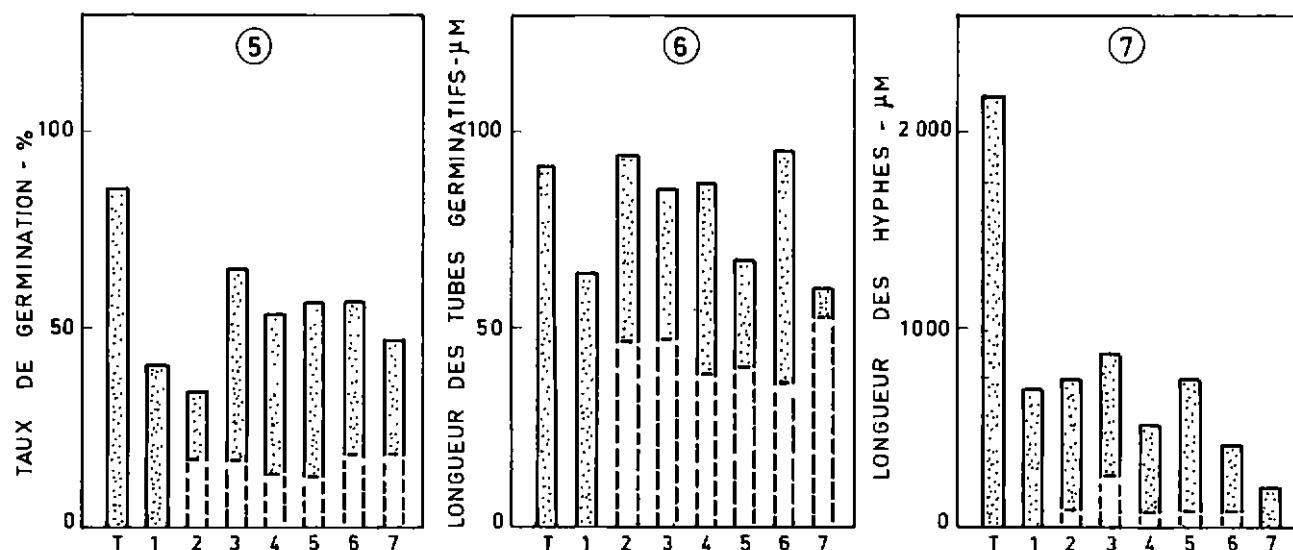


FIG. 5. — Inhibition *in vitro* de la germination de spores de *F. oxysporum* f. sp. *elaedis* en fonction de la nature de l'inhibiteur.

— : un seul inhibiteur : n° 1 alcool diénique de synthèse à 30 µg/ml, nos 2 à 7 : 100 µg/ml de composés phénoliques, respectivement acide caféique (2), aldéhyde benzoïque (3), acide dihydroxy 3,4 benzoïque (4), parahydroxybenzoate d'éthyle (5), vanilline (6) et acide férulique (7).

-- : association de 30 µg/ml d'alcool diénique de synthèse et de 100 µg/ml de composés phénoliques. Incubation : 48 heures

FIG. 6. — Inhibition *in vitro* de la croissance des tubes germinatifs de spores de *F. oxysporum* f. sp. *elaedis* en fonction de la nature de l'inhibiteur. Incubation : 48 heures.

Conditions expérimentales : voir fig. 5.

FIG. 7. — Inhibition *in vitro* de la croissance des hyphes de *F. oxysporum* f. sp. *elaedis* selon la nature des inhibiteurs.

Incubation : 3 jours.

Conditions expérimentales : voir fig. 5.

celle causée par les composés phénoliques variable selon leur nature : 80 % pour l'acide dihydroxybenzoïque, la vanilline et l'acide férulique ; 65 % pour l'acide caféique, l'aldéhyde benzoïque et le parahydroxybenzoate d'éthyle. Dans ce cas, l'inhibition par les phénols ne semble pas directement liée à la structure et aux substituants.

d) Recherche d'un effet de synergie entre inhibiteurs.

Nous avons tenté d'apprécier l'effet conjugué des diénols associés aux composés phénoliques :

— sur la germination des spores (Fig. 5) :

Alors que les différents inhibiteurs apportés seuls au milieu de culture n'avaient qu'une action modérée sur la germination des spores du parasite, les associations alcool diénique/phénols se révèlent très toxiques. La synergie est particulièrement marquée avec l'acide dihydroxybenzoïque et le parahydroxybenzoate d'éthyle puisque le taux de germination est réduit de 85 % par rapport au témoin. Les autres associations provoquent une diminution de 75 % de la germination par rapport au témoin.

— sur l'élongation des tubes germinatifs (Fig. 6) :

Toutes les associations alcool diénique/phénols étudiées réduisent de 50 à 60 % l'élongation des tubes germinatifs par rapport au témoin. Seul le couple alcool diénique/acide férulique ne semble pas augmenter sa toxicité pour le parasite.

— sur la croissance des microthalles (Fig. 7) :

La toxicité est très fortement augmentée par l'association alcool diénique/phénols. Elle varie entre 90 et 95 % selon les motifs par rapport au témoin, elle est totale pour le couple alcool diénique/acide férulique.

DISCUSSION-CONCLUSION

L'accumulation de diénols dans les tissus de racines de palmier à huile semble une réaction commune chez l'*Elaeis guineensis*. Comme chez la tomate [Vernenghi, 1985], des différences d'aptitude à synthétiser ces phytoalexines sont décelées selon l'origine du matériel végétal. De surcroît, nous observons des écarts importants de teneurs chez des lignées reproduisant le même hybride, L 2 T × D 10. Au stade actuel des recherches, la plasticité de réaction des lignées ou des clones [Taquet, 1985, Taquet *et al.*, 1985 a] semble aller de pair avec l'accumulation de diénols dans les tissus. D'après nos essais, cette potentialité s'exprime chez des plants âgés de 4 à 26 mois, c'est-à-dire correspondant aux stades pépinière et plantation.

L'application de médiateurs chimiques se traduit par des stimulations de synthèses de diénols différentes selon les substances élictrices mais celles-ci varient dans le même sens que l'accumulation des composés phénoliques. Les hexoses amines, oligomères de chitosanes identifiés comme éliciteurs chez des *Fusarium* sp. [Hadwiger et Loschke, 1981] stimulaient modérément les réactions de défense en serre [Taquet, 1985]. Nous le confirmons [Subba Rao, 1985] ainsi que pour l'élaboration de diénols.

Parmi les acides gras insaturés et leurs dérivés oxygénés, nous avons décelé d'importantes différences. Les diénols de synthèse ne modifient pas la réaction d'une lignée et d'un clone pendant 4 semaines, une tardive augmentation des teneurs en produits naturels étant décelée à la 7^e semaine. Nous pouvons présumer qu'aux doses appliquées, les diénols de synthèse n'élicitent pas plus que le parasite seul les biosynthèses de facteurs de résistance dans les tissus infectés. Les triénols de synthèse possédant également des propriétés inhibitrices *in vitro* [Vernenghi *et al.*, 1985] stimulent nettement les réactions de défense sur une

période de 7 semaines. Les expériences les plus récentes confirment les propriétés élicitrices de l'acide arachidonique.

Nous avons précédemment émis l'hypothèse d'une complémentarité d'élicitation par les chitosanes du parasite et par l'acide arachidonique appliqué aux jeunes plants [Taquet, 1985] pouvant expliquer l'accroissement des réactions de défense. Les études *in vitro* de complémentarité des éliciteurs glucidiques et lipidiques [Darvillet et Albersheim, 1984] tendent à conforter cette interprétation.

Il semble que l'inclusion de l'acide arachidonique dans des cyclodextrines ne modifie pas la fonction élicitrice mais l'étale dans le temps. Cette propriété pourrait être la conséquence d'une protection de l'éliciteur par les cyclodextrines contre l'action des lipoxygénases de l'hôte. Nous envisageons également d'étudier l'action des enzymes lytiques de la plante et du parasite sur la dégradation des cyclodextrines et la libération de l'éliciteur *in situ*.

Enfin, les dérivés oxygénés de l'acide arachidonique, principalement le monohydroxylé, appliqués directement ou incorporés dans des cyclodextrines, s'avèrent plus actifs que l'acide arachidonique. Cette augmentation d'efficacité pourrait être en relation, chez les deux acides insaturés en C18 et C20 étudiés, avec les fonctions oxygénées susceptibles d'agir sur la structure membranaire et sur la perméabilité [Vernenghi, 1985 ; Keppler et Novacky, 1986]. Nous envisageons d'étudier la persistance de l'action élicitrice de dérivés oxygénés de ces deux acides insaturés non seulement pour la synthèse des diénols mais aussi pour celle des autres phytoalexines.

Les tests de toxicité réalisés *in vitro* révèlent une nette différence d'action des diénols de synthèse ou naturels sur les organes du parasite. Ainsi, la germination des microconidies est moins inhibée que les autres étapes du cycle car elle nécessite surtout une absorption d'oxygène. Par contre, les microthalles sont très sensibles à l'action des diénols dans de brefs délais. Ces résultats corroborent ceux obtenus *in vitro* pour l'inhibition de *Phytophthora parasitica* [Vernenghi, 1985].

Une synergie entre inhibiteurs lipidiques et phénoliques

[Taquet, 1985] avait été observée *in vitro*. Il se confirme que les diénols du palmier à huile associés aux principaux composés phénoliques accumulés lors des réactions de défense — 4 OH benzoate d'éthyle, les aldéhydes benzoïques, les acides cinnamiques — accroissent notablement leur toxicité. Cette propriété est due à la complémentarité des cibles des inhibiteurs chez le champignon parasite [Vernenghi *et al.*, 1985]. Elle est susceptible d'application en sélection puisque les lignées et les clones ne réagissent pas de façon similaire à l'élicitation. D'après les analyses réalisées en C.L.H.P., en serre et en préépinière les lignées les plus plastiques réagissent à l'élicitation en accumulant non seulement des diénols, mais aussi des phytoalexines phénoliques [Taquet, 1985].

La mise en évidence chez le palmier à huile du rôle fongitoxique des diénols et des composés phénoliques élaborés au cours de la réaction de défense montre que la plante dispose d'un éventail étendu de possibilités pour réagir contre l'infection par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*. De plus, l'effet de synergie des diénols avec les composés phénoliques intervenant dans la toxicité démontre la complexité des phénomènes impliqués dans les réactions de défense. Il est probable que tous ces éléments doivent être pris en considération pour caractériser le comportement des différents types de matériel végétal.

Remerciements. — Les alcools diéniques du palmier à huile ont été identifiés par Messieurs J. Einhorn et C. Malosse, du Laboratoire des Médiateurs Chimiques, auxquels nous exprimons notre reconnaissance.

Les auteurs remercient également M. Kunesch ainsi que Mesdames Ramiandrasoa et Chuilon, du Laboratoire INRA-CNRS des Médiateurs Chimiques, pour la préparation d'alcools diéniques de synthèse et celle de complexes d'acide arachidonique ou de son dérivé hydroxylé dans les cyclodextrines (brevet ANVAR n° 8605001 déposé par l'ORSTOM, le CNRS et l'INRA). Ils expriment leur gratitude à M. Pelletier de l'ORSTOM pour la réalisation des infections expérimentales en serres et au personnel technique de l'IRHO à Dabou pour les tests en pépinières.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DARVILL G. & ALBERSHEIM P. (1984). — Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, p. 243-275.
- [2] HADWIGER L. A. & LOSCHKE D. C. (1981). — Molecular communication in host parasite interaction: hexosamines polymers (chitosan) as regulators compounds in race-specific and other interaction. *Phytopathology*, 71 (7), p. 756-762.
- [3] KATO T., YAMAGUCHI Y., UYEHARA T. *et al.* (1983). — Self defensive substances in rice plant against rice blast disease. *Tetrahedron Letters*, 24 (43), p. 4715-4718.
- [4] KATO T., YAMAGUCHI Y., OHNUMA S. *et al.* (1986). — Structural elucidation of 11-hydroxy-12,13-epoxyoctadeca-(9Z, 15Z) dienoic acids from rice plants suffering from rice Blast disease. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 743-744.
- [5] KEPPLER L. D. et NOVACKY A. (1986). — Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathology*, 76 (1), p. 104-108.
- [6] MEUNIER J. et GASCON J. P. (1972). — Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'IRHO. *Oléagineux*, 27, N° 1, p. 1-12.
- [7] MEUNIER J., RENARD J. L. et QUILLEC G. (1979). — Hérité de la résistance à la fusariose chez le palmier à huile *Elaeis guineensis*. *Oléagineux*, 34 (12), p. 555-561.
- [8] RENARD J. L., GASCON J. P. et BACHY A. (1972). — Recherches sur la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux*, 27 (12), p. 581-591.
- [9] RENARD J. L., NOIRET J. M. et MEUNIER J. (1980). — Sources et gammes de résistance à la fusariose chez le palmier à huile *Elaeis guineensis* et *Elaeis melanococca*. *Oléagineux*, 35 (8-9), p. 387-393.
- [10] RENARD J. L. et RAVISE A. (1986). — La fusariose du palmier à huile. *Phytoma*, N° 374, p. 44-46.
- [11] SUBBA RAO P. V. (1985). — Etude comparative chez le palmier à huile à l'aptitude de lignées issues de graines et de clones provenant de multiplication végétative à élaborer des facteurs de résistance à la fusariose. *Mém. DEA de Phytopathologie*, Paris VI.
- [12] TAQUET B., RENARD J. L. et RAVISE A. (1983). — Contribution de la prémunition d'*Elaeis guineensis* à la tolérance au *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*. *Comm. au 25^e Colloque de la Sté fr. de Phytopathologie*, Toulouse. *Agronomie*, 1984, 4 (7), 698 (résumé).
- [13] TAQUET B. (1985). — Les mécanismes physiologiques de la réaction de défense du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) contre la fusariose vasculaire. Application à la recherche de nouveaux moyens de lutte. *Thèse de Doctorat de 3^e cycle*, Paris VI.
- [14] TAQUET B., RAVISE A., RENARD J. L. et KUNESCH G. (1985 a). — Modulation des réactions de défense du palmier à huile contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* (Schlecht) Toovey. Applications: prémunition et stimulation chimique. *Phytopath. Z.*, 112, p. 298-314.
- [15] TAQUET B., RENARD J. L., VERNENGHI A. *et al.* (1985 b). — Essais de stimulation de la tolérance du Palmier à huile à la

- fusariose vasculaire par application d'éliciteurs. Comm. Coll. Int. Fungicides for Crop Protection, 100 years of progress. Résumé dans Proceedings, *BC PC Monograph* N° 31, p. 289-292.
- [16] VERNENGHI A. (1985). — Réactions de défense du *Lycopersicon esculentum* Mill. à des infections cryptogamiques : mise en évidence de phytoalexines et de leurs propriétés inhibitrices. Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Paris VI.
- [17] VERNENGHI A., EINHORN J., KUNESCH G. *et al.* (1985). — Propriétés inhibitrices *in vitro* de dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés élaborés chez le *Lycopersicon esculentum* Mill. en réaction à l'infection par le *Phytophthora parasitica* Dast. *C.R. Acad. Sci.*, Sér. III, **301** (16), p. 743-749.
- [18] VERNENGHI A., KUNESCH G., RAMIANDRASOA F. *et al.* (1986). — Composition à base d'acide gras complexé par des cyclodextrines, son procédé de préparation et application phytosanitaire. Brevet ANVAR N° 8605001.
- [19] VERNENGHI A., EINHORN J., KUNESCH G. *et al.* (1986). — Phytoalexines et réactions de défense de la Tomate aux infections par *Phytophthora parasitica* et *Verticillium albo atrum*. *Can. J. Bot.*, **64**, p. 973-982.

SUMMARY

Detection in the oil palm of toxic polyenic fatty acid oxygenated derivatives for *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* ; variation in their accumulation according to crosses and methods of treatment.

A. VERNENGHI, B. TAQUET, J.-L. RENARD, A. RAVISE, *Oléagineux*, 1987, **42**, N° 1, p. 1-10.

Dienic alcohols deriving from methyl linoleate accumulate in the tissue of young oil palms inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. These oxygenated derivatives, which are not detected before infection, accumulate at different concentrations depending on the genetic origins of the progenies tested. Likewise, their accumulation in the tissues can be modulated by the application of several fungal or synthetic elicitors. The dienic alcohols are toxic *in vitro* for the pathogen. There exists a considerable synergic effect between these substances and phenolic phytoalexins in the oil palm.

RESUMEN

Busca en palma africana de derivados oxigenados de ácidos grasos poliénicos tóxicos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* ; variación de su acumulación según los cruzamientos y las modalidades de tratamiento.

A. VERNENGHI, B. TAQUET, J.-L. RENARD, A. RAVISE, *Oléagineux*, 1987, **42**, N° 1, p. 1-10.

Alcoholes diénicos derivados de linoleato de metilo se acumulan en los tejidos de palmas africanas jóvenes inoculados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. Estos derivados oxigenados que no se habían descubierto antes de la infección, se acumulan en concentraciones distintas según los orígenes genéticos de las líneas probadas. Asimismo la acumulación de los mismos en los tejidos puede modularse mediante la aplicación de varios productos utilizados a fin de aumentar la resistencia de los árboles, bien sean fúngicos o sintéticos. Los alcoholes diénicos son tóxicos *in vitro* para el agente patógeno. Hay un importante efecto de sinergia entre estas sustancias y las fitoalexinas fenólicas de la palma africana.

